



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**

**ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*Citrus sinensis* “naranja” SOBRE *Staphylococcus aureus*  
ATCC29213 COMPARADO CON OXACILINA, ESTUDIO IN  
VITRO**

---

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
MÉDICO CIRUJANO**

**AUTORA**

VALDIVIEZO FLORES MAYRA PAOLA

**ASESORES**

MGTR. DAVID RENE RODRÍGUEZ DÍAZ

MGTR. BLGO. POLO GAMBOA JAIME

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN**

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

**TRUJILLO – PERÚ**

**2019**

## **DEDICATORIA**

Dedicado a mis padres quienes me han apoyado constantemente en este largo camino de mi carrera, por todo el amor me brindan a diario, quienes me formaron con valores para ser una persona de bién.

A mis hermanos por su confianza y apoyo moral. Quienes esperan con ansias verme convertida en una profesional.

Sin ellos, hubiera sido imposible mi carrera.

Mayra Paola Valdiviezo Flores

## AGRADECIMIENTO

A **Dios** por sobre todas las cosas.

A los **docentes** por ser guías y fuentes de inspiración.

A los **asesores** por el tiempo, dedicación y paciencia para la elaboración de la tesis.

A la **Universidad Cesar Vallejo** por darme la oportunidad de ser un profesional exitoso.

Mayra Paola Valdiviezo Flores

## DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, Mayra Paola Valdiviezo Flores con DNI 45645882, estudiante de la Escuela Profesional de Medicina Humana de la Facultad de Ciencias Médicas, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Cesar Vallejo, declaro bajo juramento que todos los datos e información que acompañan a la Tesis titulada: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Citrus sinensis* "naranja" SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC29213 COMPARADO CON OXACILINA, ESTUDIO IN VITRO. Son:

1. De mi autoría
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas; por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido autoplagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados y por tanto los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad Cesar Vallejo.

Trujillo, febrero del 2019.

Mayra Paola Valdiviezo Flores

## PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: "EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Citrus sinensis* "naranja" SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC29213 COMPARADO CON OXACILINA, ESTUDIO IN VITRO", la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

La Autora

## ÍNDICE

### PÁGINAS PRELIMINARES

Página del jurado .....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Declaratoria de autenticidad .....	iv
Presentación .....	v
Resumen .....	vii
Abstract.....	1
I.INTRODUCCIÓN .....	2
1.1.Realidad problemática.....	2
1.2.Trabajos previos .....	3
1.3.Teorías relacionadas al tema .....	4
1.4.Formulación del problema.....	7
1.5.Justificación del estudio .....	7
1.6.Hipótesis.....	8
1.7.Objetivos .....	8
1.7.1.    Objetivo general.....	8
1.7.2.    Objetivos específicos.....	8
II.    MÉTODO.....	9
2.1.Diseño de investigación .....	9
2.2.Variables, operacionalización .....	10
2.3.Población Y muestra .....	11
2.4.Técnicas, procedimientos e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad .....	12
2.5.Métodos de análisis de datos .....	13
2.6.Aspectos éticos.....	13
III.RESULTADOS .....	Error! Bookmark not defined.
IV.DISCUSIÓN .....	18
V.CONCLUSIÓN.....	20
VI.RECOMENDACIONES .....	21
VII.REFERENCIAS .....	22
VIII.ANEXOS.....	25

## RESUMEN

En la presente investigación el objetivo fue evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara de *Citrus sinensis* “naranja” a las siguientes diluciones: 100%, 75%, 50%, 25%, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 comparado con oxacilina a 1 µg en un estudio in vitro. Las cepas fueron cultivadas en agar Müller- Hinton. La sensibilidad se evaluó con el método de Kirby-Bauer. Se obtuvo halo inhibitorio en todas las diluciones: al 25% 11.20 mm (DS 0.632±0.2 IC95%: de 10.75 a 11.65, entre los intervalos de 10 a 12 mm), al 50% 12.70 mm (DS 0.675±0.213 IC95%: de 12.22 a 13.18, entre los intervalos de 12 a 14 mm), al 75% 13.60 mm (DS 0.516±0.163 IC95%: de 13.23 a 13.97, entre los intervalos de 13 a 14 mm) y al 100% 15.50 mm (DS 0.850±0.269 IC95%: de 14.89 a 16.11, entre los intervalos de 14 a 17 mm); superando los valores de inhibición del CLSI ( $\geq 13$  mm) al 75% y 100%. La oxacilina tuvo un halo de 26.50 mm (DS 0.707±0.224 IC95%: de 25.99 a 27.01, entre los intervalos de 26 a 28 mm). El ANOVA fue altamente significativo ( $p=0.000$ ), la prueba de Tukey evidenció la homogeneidad de los grupos estudiados y que a mayor concentración del aceite esencial mayor es el efecto antibacteriano, sin embargo, no superó el halo inhibitorio de la oxacilina. Se concluye que el aceite esencial de *Citrus sinensis* tiene efecto antibacteriano menor que la oxacilina sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Palabras claves: aceite esencial, naranja, *Citrus sinensis*, antibacteriano, oxacilina, bacterias Gram positivas.

## ABSTRACT

The antibacterial effect of essential oil of *Citrus sinensis* “orange” peel was evaluated in an in-vitro study at dilutions of 100%, 75%, 50% and 25% on strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 compared with Oxacillin at 1 µg. The strains were cultivated in Mueller -Hinton agar, and sensitivity undertaken with Kirby-Bauer method. All dilutions produced a zone of inhibition: at 25% 11.20 mm (SD 0.632 ± 0.2 CI 95%: from 10.75 to 11.65, between intervals of 10 to 12 mm), at 50% 12.70 mm (SD 0.675 ± 0.213 CI 95%: from 12.22 to 13.18, between intervals of 12 to 14 mm), at 75% 13.60 mm (SD 0.516 ± 0.163 CI 95%: from 13.23 to 13.97, between intervals of 13 to 14 mm), and at 100% 15.50 mm (SD 0.850 ± 0.269 CI 95%: from 14.89 to 16.11, between intervals of 14 to 17 mm); exceeding inhibition values of CLSI (≥13 mm) in the concentrations of 75% and 100%. Oxacillin had a zone of inhibition of 26.50 mm (SD 0.707 ± 0.224 CI 95%: from 25.99 to 27.01, between intervals of 26 to 28 mm). ANOVA statistical analysis was very significant (0.000), Tukey-test showed homogeneity in the groups studied and that the greater the concentration of essential oil, the greater the antibacterial effect, but not exceeding that of oxacillin. It is concluded that essential oil of *Citrus sinensis* has an antibacterial effect, but less than that of oxacillin.

**Key words:** Essential oil, orange, *Citrus sinensis*, antibacterial, oxacillin, Gram positive bacteria



## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA

Las enfermedades infecciosas han alcanzado un grado de resistencia a múltiples fármacos como la meticilina y la vancomicina en países en vías de desarrollo. Después del continente asiático, América es el segundo continente donde se reportaron casos de resistencia a meticilina. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) son la tercera causa de muerte, alcanzando una prevalencia de 36% por cada 100.000 sujetos en Latinoamérica. Así mismo entre los microorganismos que con mayor frecuencia ocasionan dichas enfermedades son los virus (75 %), seguido de las bacterias (48 %).<sup>1</sup>

*Staphylococcus aureus* se caracteriza por ser un patógeno común en infecciones dérmicas, vinculado a una tasa considerable de morbilidad y mortalidad, *S. aureus* es conocido por causar forúnculos (80%), orzuelos (26%), impétigo (20%) y otras infecciones en el tejido tegumentario. Aproximadamente el 30% de la población humana está colonizado con *S. aureus*. En el mundo industrializado, la incidencia en la población de bacteria por *S. aureus* varía de 10 a 30 por 100.000 personas.<sup>2</sup>

La Organización Panamericana de la Salud, reportaron casos de *Staphylococcus aureus* resistente a metilcilina (SAMR) adquirido en la comunidad, sigue siendo un patógeno peligroso para el individuo, a pesar de la mejora continua en la atención al paciente, la infección por *S. aureus* permanece asociada con una considerable morbilidad y mortalidad, tanto en los hospitales como en la comunidad. Tiene una prevalencia de 5% en América latina. Según prevalencia que está en incremento a causa del uso indiscriminado de medicamentos, omisión a la culminación del tratamiento y factores genéticos propios del patógeno.<sup>3</sup>

El centro de control y prevención de enfermedades, informa que las tasas de transmisión directa son 25% a 50%. Las tasas más altas en la población general se observan en los usuarios de drogas inyectables, inmunosuprimidos, personas con diabetes dependiente de la insulina, pacientes con afecciones de la piel, pacientes con sistemas prolongados de catéteres intravasculares, y trabajadores de la salud.<sup>4</sup>

Ante el sombrío panorama de resistencia bacteriana a grupos de antibióticos, se están desarrollando nuevas medidas terapéuticas a partir de vegetales naturales. *Citrus sinensis* "naranja" ha demostrado tener efectos inhibitorios en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* mediante sus principios activos.<sup>5</sup>

## 1.2. TRABAJOS PREVIOS

**Aburowais A et al (Malaysia, 2017)**, estudiaron el efecto antibacteriano del aceite esencial, obtenido por hidrodestilación de la cáscara del *Citrus sinensis* (naranja) sobre patógenos Gram positivos y Gram negativos, mediante la técnica de difusión en discos, encontrando a la concentración del 100% un halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* de 7.33 mm +/- 1.15, *Escherichia. coli* 8.66 mm +/- 0.75. El estudio concluyó demostrando que el aceite esencial del *Citrus sinensis* tiene buena actividad antimicrobiana para patógenos Gram positivos y negativos.<sup>6</sup>

**Hasija S et al (India, 2015)**, estudiaron el efecto antibacteriano del aceite esencial, obtenido por arrastre con vapor de agua de la cascara del *Citrus sinensis* (naranja) sobre patógenos Gram positivos y Gram negativos, mediante la técnica de difusión en discos, encontrando un halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* de 9.67 mm +/- 1.527, *E. coli* 11.33 mm +/- 0.57 y *Salmonella thiphy* 10.33 mm +/- 0.57. Concluyeron que el aceite esencial del *Citrus sinensis* tiene buena actividad antimicrobiana para patógenos Gram positivos y negativos.<sup>7</sup>

**Obidi O et al (Nigeria, 2013)**, evaluaron la actividad antibacteriana del aceite esencial del *Citrus sinensis* (naranja) en diversas concentraciones, desde 1.65 mg/ml hasta 422 mg/ml, mediante la técnica de difusión en discos de agar, los patógenos en estudio fueron bacterias Gram positivas y Gram negativas. El efecto antibacteriano se obtuvo mediante la medición de los halos de inhibición, encontrando para *Staphylococcus aureus* un halo en su mayor concentración del aceite de 15 mm, *Enterococcus fecalis* fue 28 mm, *E. coli* fue 20 mm y para *P. aeruginosa* fue 10 mm. Concluyeron que el aceite esencial de naranja tiene buena actividad antibacteriana contra cepas Gram negativas y moderada actividad para Gram positivos.<sup>8</sup>

**Espina L et al (España, 2010)**, evaluaron la efecto antibacteriano sinérgico del aceite esencial del *Citrus sinensis* y *Citrus limón* mediante la técnica de difusión en discos de agar y el método de kirby-Bauer frente a patógenos Gram positivos y negativos, encontrando para *Staphylococcus aureus* un halo de inhibición de 18.8 mm +/- 1.0, *L. monocitogenes* de 14.4 mm +/-1.4, *E.coli* un halo de 20.0

mm +/- 2.2. Concluyeron que el efecto sinérgico de los dos cítricos tiene mayor actividad frente a patógenos Gram negativos.<sup>9</sup>

**Juárez J et al (Perú, 2010)**, investigaron la composición química de *Citrus sinensis* y la actividad antibacteriana de su aceite esencial, mediante la técnica de difusión en discos de agar, frente a patógenos Gram positivos y Gram negativos, encontrando para *Staphylococcus aureus* un halo de inhibición de 28 mm (al 100% de concentración) y 25 mm (al 50% de concentración), *E. coli* no se identificó inhibición del crecimiento. Concluyeron que el aceite esencial tiene mayor efecto en patógenos Gram positivos.<sup>10</sup>

### 1.3. TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA

Los cítricos son cultivos permanentes y data su origen hace más de 20 millones de años en las zonas tropicales asiáticas, en el Archipiélago Malayo. La producción mundial se concentra en 5 países, siendo esta en el año 2010 liderada por China, seguido de Brasil y Estados Unidos de América, estos últimos países continúan teniendo la mayor producción del cítrico. En el Perú los departamentos con mayor capacidad productiva más importantes son Junín, Lima y San Martín. Los principales factores que influyen en su cultivo son la temperatura, la humedad, la luminosidad y el suelo. En general, las especies de cítricos pueden crecer y fructificar en un rango de 10 - 40 °C, y en forma óptima de 24 - 32 °C.<sup>11</sup>

De acuerdo a su clasificación taxonómica pertenece a la clase magnoliopsida, subclase rosidae, orden sapindales, familia rutaceae, género *citrus*, especie *citrus sinensis*. El contenido del aceite esencial en la cáscara de naranja está compuesta en más del 90% por sesquiterpenos los cuales el más importante de la naranja que la diferencia del resto de los cítricos es el valenceno presente en la cera cuticular, los principales terpenos presentes son el limoneno, el  $\alpha$ -pineno, b-mirceno y terpinoleno, los principales compuesto oxigenados son el linalol y el decanol. El limoneno, representante de los terpenos es el precursor de los principales componentes de la esencia que contribuye a la actividad antimicrobiana del aceite.<sup>12</sup>

Se conocen alrededor de unos 3000 aceites esenciales, de los cuales unos 300 son los más importantes. Desde hace mucho tiempo se han reconocido las propiedades antibacterianas de estos, por lo que en la actualidad tienen aplicación terapéutica. Además de sus grandes

propiedades antibacterianas, también han demostrado tener función antioxidante, antivírico, antifúngicas y antitumoral.<sup>13</sup>

Los aceites esenciales son una mezcla de sustancias orgánicas, resultado del metabolismo de las plantas así mismo son compuestos volátiles, líquidos a temperatura de ambiente, incoloros, con índice de refracción elevado, solubles en alcohol de alta graduación, aromáticos, lipofílicos, menos denso que el agua e insolubles en agua, extraídos frecuentemente por arrastre de vapor de agua. El aceite esencial lo encontramos en diferentes partes de la planta, las estructuras secretoras son especialmente la cáscara y las flores.<sup>14</sup>

La forma terapéutica de aplicación del aceite es por diferentes vías, la más frecuente y recomendada, por ser menos lesiva, es la vía tópica, ya que atraviesan las distintas capas de la piel con mucha facilidad, siendo la epidermis una de las más beneficiadas por ser la capa superficial. El tiempo de duración del uso es de 1 - 3 semanas por vía cutánea. Poseen toxicidad débil, puede ser irritante y raramente ocasiona reacciones de hipersensibilidad, excepto en individuos con dermatitis.<sup>15</sup>

La bacteria *Staphylococcus aureus* es considerado actualmente el principal responsable de la mayoría de las enfermedades estafilocócicas. Supone un problema grave de salud por su capacidad destructora y su resistencia a múltiples antimicrobianos. *S. aureus* causa enfermedad al infectar los tejidos típicamente mediante la aparición de abscesos o la producción de toxinas. Generalmente, el hospedador tiene que dar ciertas facilidades para que este pueda infectarlo, como una grieta en la piel o un cuerpo extraño insertado en el organismo. Las enfermedades causadas por *S. aureus* pueden ser debidas a una infección invasiva que supera los mecanismos defensivos del hospedador y produce sustancias extracelulares que facilita la invasión.<sup>16</sup>

El género *Staphylococcus* tiene cerca de 30 especies, de las cuales el más resaltante es *S. aureus*. Es un coco Gram positivo, con un diámetro de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , tiene forma de racimo de uvas, es una bacteria no móvil, no esporulada, no posee cápsula, es anaerobia facultativa. *S. aureus* contiene dentro de su pared sustancias de importancia estructural. El péptidoglucano, representa la mitad de pared celular en peso, característica que poseen las bacterias Gram positivas, el cual está formado por capa de cadenas de glucanos constituidas por 10 o 12 subunidades de ácido N-acetil-murámico y N-acetil-glucosamina, proporcionando una mayor rigidez a la pared celular y aportando

estabilidad osmótica. La mayoría originan catalasa (enzima idóneo para desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno).<sup>17</sup>

Los estafilococos son bacterias Gram positivas esféricas de 1 µm de diámetro, distribuidos en forma de racimos irregulares que son semejantes a las uvas. Los estafilococos patógenos producen hemólisis, coagulación plasmática, enzimas y toxinas extracelulares como la catalasa, la cual transforma el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Crecen con facilidad en todos los medios bacteriológicos, el agar Chapman Manitol es un medio idóneo para aislar el *Staphylococcus aureus*, basado en la tolerancia que posee a una alta concentración de cloruro sódico. Crecen en condiciones aerobias o micro-aerofílicas; crecen con mayor rapidez a 37°C produciendo colonias de color gris-amarillo o dorado.<sup>18</sup>

La oxacilina es un antibiótico betalactámico, antibacteriano sistémico, perteneciente al grupo de las penicilinas semisintéticas. Activo contra *Staphylococcus* productores de beta lactamasa, de administración parenteral y oral. Inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana, induciendo un efecto autolítico uniéndose a enzimas llamadas PBP que están localizadas debajo de la pared bacteriana. Al unirse a las PBP la oxacilina impide la tercera etapa o de transpeptidación debilitando la pared, haciéndola frágil y susceptible a la lisis. El espectro antibacteriano incluye Gram positivos, especialmente *Staphylococcus*.<sup>19</sup>

#### 1.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Tiene efecto antibacteriano in-vitro el aceite esencial de la cáscara de *Citrus sinensis* “naranja” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 comparado con Oxacilina a dosis de 1 µg, en un estudio in vitro?

#### 1.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

*Staphylococcus aureus* es un patógeno frecuente, involucrado en muchas infecciones microbianas. Actualmente se ha reportado una alta resistencia a los antibióticos de uso convencional, motivo por el cual se está a la búsqueda de productos alternativos y complementarios de origen natural o vegetal, donde la fitoterapia constituye una alternativa terapéutica segura, eficaz y de calidad, puesto que, en los diferentes estudios publicados han demostrado ser menos inocuos en comparación con el tratamiento farmacológico.<sup>7,10</sup>

Uno de los objetivos de la OMS sobre la medicina tradicional y complementaria es promover el uso de las plantas que muestran menos efectos adversos y tienen acción más prolongada en el tiempo, respaldadas y validadas por investigaciones científicas.<sup>20</sup>

Por tanto, es apropiado continuar con la investigación de nuevas plantas, entre ellas *Citrus sinensis* “naranja” por los resultados obtenidos en los diferentes estudios. En el campo de la investigación clínica y farmacológica abre más posibilidades, siendo una alternativa o un complemento natural, eficiente, de bajo costo y con pocos efectos adversos para el tratamiento de las múltiples infecciones que se producen por *S. aureus*, aprovechando así su uso para poder atenuar procesos patológicos que desencadenan las enfermedades actuales.

Contexto en el cual se sustenta el desarrollo del presente trabajo, donde se busca conocer si el aceite esencial de naranja tiene acción antimicrobiana sobre *S. aureus*.

## 1.6. HIPÓTESIS

**H1:** El aceite esencial de la cáscara de *Citrus sinensis* “naranja” tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 comparado con oxacilina a dosis de 1 µg, en un estudio in vitro.

**H0:** El aceite esencial de la cáscara de *Citrus sinensis* “naranja” no tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 comparado con oxacilina a dosis de 1 µg, en un estudio in vitro.

## 1.7. OBJETIVOS

### 1.7.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si el aceite esencial de la cáscara del *Citrus sinensis* “naranja” tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, comparado con oxacilina a dosis de 1 µg en un estudio in vitro.

### 1.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara del *Citrus sinensis* “naranja” a la concentración de 100%.
- Establecer el efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara del *Citrus sinensis* “naranja” a la concentración de 75%.
- Establecer el efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara del *Citrus sinensis* “naranja” a la concentración de 50%.
- Establecer el efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara del *Citrus sinensis* “naranja” a la concentración de 25%.
- Establecer el efecto antibacteriano de Oxacilina a dosis de 1 µg sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, en un estudio in vitro.

## II. MÉTODO

### 2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

**TIPO DE INVESTIGACIÓN:** Básico.

**DISEÑO DE INVESTIGACION:** Experimental con repeticiones múltiples y post prueba.

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5
RG6	X6	O6

Donde:

RG: Cepas de *Staphylococcus aureus*

X1: Aceite esencial del *Citrus sinensis* a la concentración 100%.

X2: Aceite esencial del *Citrus sinensis* a la concentración 75%.

X3: Aceite esencial del *Citrus sinensis* a la concentración 50%.

X4: Aceite esencial del *Citrus sinensis* a la concentración 25%.

X5: Control positivo: Oxacilina a dosis de 1 µg.

X6: Control negativo: Dimetil Sulfoxido (DMSO).

O: Las observaciones del diámetro del halo de inhibición



## 2.2. VARIABLES, OPERACIONALIZACIÓN

**VARIABLE INDEPENDIENTE:** Agente antibacteriano

- **Agente antibacteriano no farmacológico:** Aceite esencial de la cáscara de *Citrus sinensis* “naranja”
- **Agente antibacteriano farmacológico:** Oxacilina a dosis 1 µg.

**VARIABLE DEPENDIENTE:** Efecto antibacteriano

- **Efecto antibacteriano:** aumento del halo de inhibición  $\geq 13$  mm.
- **Sin efecto antibacteriano:** halo de inhibición  $< 13$  mm.

### OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición
<b>V.I.:</b> Agente antibacteriano	Sustancia química capaz de inhibir e, incluso, destruir microorganismos sin producir efecto tóxicos en el huésped. <sup>22</sup>	Aceite esencial de <i>Citrus sinensis</i> dividida en las siguientes diluciones: a) al 100% b) al 75% c) al 50% d) al 25%  Oxacilina a 1 µg  DMSO	RG1 RG2 RG3 RG4 RG5 RG6	<b>Cualitativa nominal</b>
<b>V.D.:</b> Efecto antibacteriano	Capacidad de una sustancia química que actúa contra los microorganismos, destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento. <sup>18</sup>	<b>Según CLSI se considera:</b> <sup>23</sup> a) Sensible: $\geq 13$ mm b) Intermedio: 11-12 mm c) Resistente: $\leq 10$ mm	<b>Si efecto antibacteriano</b> $\geq 13$ mm  <b>No efecto antibacteriano</b> $< 13$ mm	<b>Cualitativa nominal</b>

### 2.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

**POBLACIÓN:** Fue constituida por el conjunto de colonias de cepas de *Staphylococcus aureus* cultivados en el laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo.

#### MUESTRA:

**Tamaño de la muestra:** por tratarse de un trabajo experimental se empleó la formula estadística de diferencia de promedio sobre halos de inhibición, para hallar el número de repeticiones necesarias que validen la investigación. Se obtuvo 10 repeticiones por cada grupo experimental de estudio.<sup>24</sup>

$$n = \frac{(z_{\alpha/2} + z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

Donde:

$\frac{Z_{\alpha}}{2} = 1.96$  Para un nivel de confianza al 95%

$Z_{\beta} = 0.84$  Para una potencia de prueba al 80%

$\bar{x}_1 = 13$  mm<sup>23</sup>

$\bar{x}_2 = 9.67$  mm<sup>7</sup>

$\sigma^2 : 1.527^7$

n = 4 número mínimo de repeticiones por cada concentración

Se utilizaron 10 repeticiones por cada concentración

**Unidad de análisis:** Cada uno de los cultivos de cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

**Unidad de muestra:** Cada placa Petri con cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

**Muestreo:** No probabilístico

**CRITERIOS DE SELECCIÓN:** Se consideró los siguientes criterios.

**Criterios de inclusión:**

- Placas Petri con cultivos viables
- Cepas cultivadas de 18 -24h

**Criterios de exclusión:**

- Cepas que no crecieron en el medio de cultivos
- Cepas o muestra contaminada.

## **2.4. TÉCNICAS, PROCEDIMIENTOS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD**

### **LA TÉCNICA:**

Fue la observación directa del crecimiento bacteriológico de los cultivos en las placas Petri.

### **PROCEDIMIENTO:**

- a. Se procedió a realizar la Certificación de la planta por parte de la Universidad Antenor Orrego (Ver Anexo 01)
- b. La extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* “naranja” se obtuvo mediante la técnica de arrastre a vapor de agua.<sup>25</sup> (Ver Anexo 02)
- c. Se realizó la determinación de la sensibilidad antibacteriana por el método de disco difusión Kirby-Bauer y el medio de cultivo empleado para el *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 fue Agar Müller- Hinton<sup>26</sup>(Ver Anexo 03)

### **INSTRUMENTO:**

El instrumento que se utilizó fue la ficha de recolección de datos que consiste en observar las placas, diluciones y halos de inhibición a las 48 horas.<sup>27</sup> (Ver Anexo 04).

### **VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO**

El instrumento fue validado por opinión de tres profesionales del área en quienes evaluaron las variables de estudio y los ítems considerados en la ficha de recolección de datos, y determinar si son relevantes al estudio y tienen claridad, objetividad, actualidad, organización, suficiencia, intencionalidad, consistencia, coherencia, metodología y oportunidad para su aplicación. (Ver Anexo 05)

## **2.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS**

La información obtenida fue tabulada en una ficha Excel, y luego se analizó en el programa SPSS versión 25 para Windows.

Las pruebas estadísticas realizadas fueron análisis de varianza (ANOVA), para evaluar la diferencia significativa entre los diámetros y la técnica post ANOVA de Tukey para evaluar la homogeneidad de los grupos de estudio y evidenciar el grupo con mayor eficacia inhibitoria.

## **2.6. ASPECTOS ÉTICOS**

En el estudio se tomó en cuenta las medidas de bioseguridad en el laboratorio dadas por el Ministerio de Salud<sup>28</sup> (Ver Anexo 06). Así mismo se consideró la aprobación del Comité de Investigación de la Facultad De Ciencias Médicas de la Universidad César Vallejo de Trujillo.

En el presente trabajo se respetó el principio de ética adoptado en el capítulo 6 del código de ética del Colegio Médico del Perú, Art 48.<sup>29</sup> (Ver Anexo 07)

### III. RESULTADOS

**Tabla 01:** Efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara de *Citrus sinensis* “naranja” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 comparado con oxacilina 1 µg, en un estudio in vitro.

DATOS DESCRIPTIVOS								
Tratamiento	N	Media	Desv.	Desv. Error	95% del IC para la media		Mín.	Máx.
					Límite inferior	Límite superior		
<i>Citrus sinensis</i> al 100%	10	15,50	0,850	0,269	14,89	16,11	14	17
<i>Citrus sinensis</i> al 75%	10	13,60	0,516	0,163	13,23	13,97	13	14
<i>Citrus sinensis</i> al 50%	10	12,70	0,675	0,213	12,22	13,18	12	14
<i>Citrus sinensis</i> al 25%	10	11,20	0,632	0,200	10,75	11,65	10	12
Oxacilina	10	26,50	0,707	0,224	25,99	27,01	26	28

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25

**Tabla 02:** Efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara de *Citrus sinensis* “naranja” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 comparado con oxacilina 1 µg, en un estudio in vitro.

**ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA)**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Media		
			cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1501.400	4	375.4	800.5	0.000
Dentro de grupos	21.100	45	0.469		
Total	1522.500	49			

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25

**Tabla 03:** Efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara de *Citrus sinensis* “naranja” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 comparado con oxacilina 1 µg, en un estudio in vitro.

**ANALISIS POST ANOVA: TUKEY**

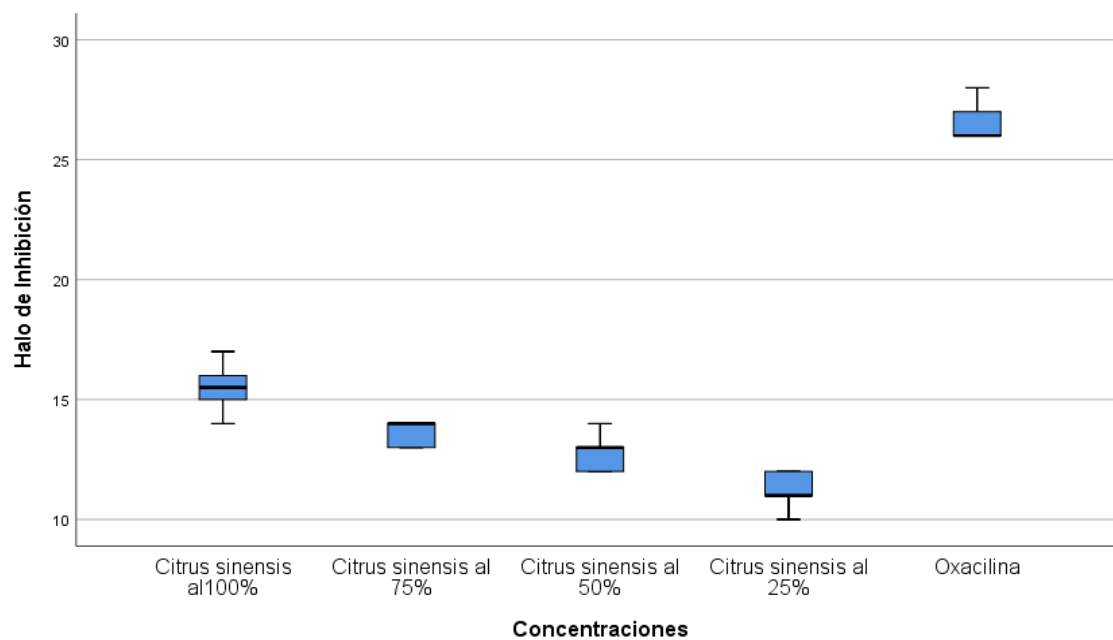
HSD Tukey<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>Citrus sinensis</i> al 25%	10	11,20				
<i>Citrus sinensis</i> al 50%	10		12,70			
<i>Citrus sinensis</i> al 75%	10			13,60		
<i>Citrus sinensis</i> al 100%	10				15,50	
Oxacilina	10					26,50
<b>Sig.</b>		<b>1,000</b>	<b>1,000</b>	<b>1,000</b>	<b>1,000</b>	<b>1,000</b>

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10.000.

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25



Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25

**GRÁFICO 01:** Efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara de *Citrus sinensis* “naranja” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 comparado con oxacilina 1 µg, en un estudio in vitro.



#### IV. DISCUSIÓN:

Con el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara del *Citrus sinensis* naranja sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 comparado con oxacilina 1 µg, las cepas fueron cultivadas en agar Müller- Hinton, la sensibilidad se realizó con el método de Kirby-Bauer. Se desarrolló un estudio in vitro donde se observó 10 placas con un total de 50 cultivos. En cada placa Petri se colocaron un total de 5 discos de los cuales 4 de ellos representaban el aceite esencial de la cascara de *Citrus sinensis* naranja a distintas concentraciones (100%, 75%, 50%, 25%) se comparó con el patrón de oxacilina 1 µg.

En la **tabla 01** se analizan las medias de los halos de inhibición de cada grupo de experimentación, se puede observar que el aceite esencial del *citrus sinensis* a la concentración del 75% evidencia un halo de inhibición medio de 13.60mm (DS  $0.516 \pm 0.163$  y su valor mínimo de 13 y valor máximo de 14 IC al 95%: 13.23 a 13.97) a la concentración del 100% la media fué de 15.50 mm (DS  $0,85 \pm 0.269$  con un mínimo de 14 y un máximo de 17mm y su IC al 95%: 14.89 a 16.11) a estas dos concentraciones según el CLSI ( $\geq 13$ mm), se considera que el aceite esencial tiene efecto inhibitorio para *S. aureus*.

Sin embargo, estos resultados comparados con el estudio de Aburowais A. et al<sup>6</sup> muestran gran variabilidad, quienes reportaron un halo de inhibición de  $7.33 \text{ mm} \pm 1.15$  mediante la técnica en discos y a la concentración del 100%, los mismos aplicados en nuestro estudio, sin embargo para el este halo demostró ser sensible, pero se juzga por la existencia de una discreta inhibición considerándose como despreciable ya que no alcanza los valores deseados por el CLSI. La diferencia con los otros estudios puede deberse a la influencia que tiene el medio ambiente (terreno, minerales en las tierras de cultivo, temperatura, humedad) sobre el desarrollo de las plantas y sus frutos, ya que estos factores determinan la composición y la concentración de sus componentes fitoquímicos o la vitalidad de los mismos. Otra razón a considerar es el mecanismo de acción del principio activo de la naranja (limoneno), que por ser una planta natural ejerce débil habilidad para penetrar la pared bacteriana, desnaturalizar el metabolismo celular y hacer lisis. Así mismo estos resultados se apoyan a los reportados por Hasija S. et al<sup>7</sup> quienes reportaron halos de inhibición similares de  $9.67 \text{ mm} \pm 1.527$  a pesar de que se empleó el mismo método de extracción del aceite esencial en ambos estudios y a la misma concentración, los resultados fueron inferiores al nuestro.

Sin embargo valores mayores encontraron Obidi O. et al<sup>8</sup> con un halo de inhibición de 15 mm para *S. aureus*, casi semejante a nuestro estudio. De igual manera Espina L. et al<sup>9</sup> quien encontró un halo de inhibición un poco mayor de  $18.8 \text{ mm} \pm 1$  para *s. aureus*, Juárez J. et al<sup>10</sup> encontró a la concentración del 100% un halo de inhibición de 28 mm y a la concentración de 50% un halo de

25mm para *Staphylococcus aureus*. En estos estudios se pudo evidenciar que el aceite esencial de naranja, sí demostró tener efecto antibacteriano, a las concentraciones (75% y 100%), por lo que el uso del aceite de *Citrus sinensis* a estas dos concentraciones podría ser una alternativa a los problemas asociados a la aparición de resistencia bacteriana a los antibióticos de uso común. Sin embargo menor al de la oxacilina que mostró una mayor zona de crecimiento de 26.50 mm (DE  $0.707 \pm 0.224$  con un valor mínimo de 26 y máximo de 28, IC al 95%: 25.99 a 27.01) es casi dos veces más, que el halo de inhibición. Esto se puede explicar al gran mecanismo de acción de la oxacilina, que como antibiótico betalactámico y sistémico, posee superior efecto autolítico que la naranja, que hace más susceptible a la pared bacteriana de *S. aureus*.

**En la tabla 02** en el análisis de varianza se evidencia que los resultados son altamente significativos (ANOVA  $p=0.0000$ ), que implica que al menos una de las concentraciones del aceite esencial de la cáscara en estudio es mejor que la otra, rechazándose la hipótesis nula y aceptándose la alterminación (*Citrus sinensis* tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus*) además consideramos la existencia de la homogeneidad de sus varianzas por lo que es pertinente la ejecución de la prueba post anova de Tuckey Tabla 03 donde se puede visualizar las diferentes diluciones y halo de inhibición en cada grupo, donde se observa que a mayor concentración del aceite esencial mayor es el halo de crecimiento (75% y 100%), sin embargo oxacilina mostró superior halo de inhibición.

**En el gráfico 01** en el diagrama de cajas y bigotes, se puede visualizar claramente el comportamiento de las medidas de los halos de inhibición a diferentes diluciones del aceite comparado con la oxacilina, en todas las concentraciones se evidencia algún grado de inhibición, siendo mayor cuando aumenta la concentración (75% y 100%). Por lo tanto *Citrus sinensis* ha demostrado tener efectos inhibitorios en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* mediante sus principios activos ya descritos. Por lo tanto, en el campo de la investigación clínica y farmacológica abre más posibilidades como tratamiento coadyuvante, siendo una alternativa natural, eficiente, de bajo costo y con pocos efectos adversos para el tratamiento de las múltiples infecciones que se producen por *S. aureus*, aprovechando así su uso para poder atenuar procesos patológicos que desencadenan las enfermedades actuales.

#### IV. CONCLUSIÓN

- El aceite esencial de la cáscara de *Citrus sinensis* “naranja” demostró tener efecto antibacteriano in vitro frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 pero a la concentración del 75% y al 100%, considerado dentro de los valores del CLSI ( $\geq 13$  mm como sensible), sin embargo menor que el de la oxacilina.
- El aceite esencial de la cáscara de *Citrus sinensis* “naranja” a la concentración de 100%, presento halo de inhibición de 15.50 mm.
- A la concentración de 75%, presentó halo de inhibición de 13.60 mm.
- A la concentración de 50%, presentó halo de inhibición de 12.70 mm.
- A la concentración de 25%, presentó halo de inhibición de 11.20 mm.
- La oxacilina presentó mayor halo de inhibición de 26.50mm.

## V. RECOMENDACIONES

- Continuar haciendo investigaciones considerando otras formas de la extracción de la naranja como: Acuoso, etanólico, en recimas a fin de evaluar en que forma es mucho más eficaz como antibacteriano.
- Se recomienda ampliar el estudio con otros otros gérmenes positivos, incluso en hongos.
- Desarrollar las investigaciones en animales como en roedores para evaluar la acción antibacteriana o antimicótica en seres vivos.
- Realizar estudios comparativos sobre el efecto antibacteriano del aceite esencial de la diferentes especies de *Citrus sinensis* que existen en diferentes departamentos del Perú.

## VI. REFERENCIAS

- 1) Organización Mundial de la Salud. La mortalidad y las estimaciones globales de salud. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud; 2013. (Citado: 17/04/2017). Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/131953/1/9789240692695\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/131953/1/9789240692695_spa.pdf)
- 2) Steven Y, Joshua S, Thomas L, Vance G. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. Clin Microbiol Rev 2015; 28 (3): 603–661. (Citado: 20/05/2017). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4451395/.pdf>
- 3) Organización Panamericana de la Salud (OPS). Informe anual de red de monitoreo/vigilancia de resistencia a antibióticos. Washington, D.C: OPS; 2009. (Citado: 14/05/2017). Disponible en <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1822.pdf>
- 4) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). The Changing Epidemiology of *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis 2001; 7 (2): 178-182. (Citado: 14/05/2017). Disponible en: [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/7/2/70-0178\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/7/2/70-0178_article)
- 5) Krapp K, Longe J. Medicina alternativa. 1ª ed. Barcelona, España: Oceano/Ergon; 2010.
- 6) Aburowais A, Banu A, Nisha M. Activity of orange (*Citrus Sinensis*) and lemon (*Citrus Limon*) juice and oil on different bacteria that cause wound infection. European J Biotechnol Biosci 2017; 5(1): 26-31. (Citado: 15/04/2017). Disponible en: [http://www.lincoln.edu.my:67/uploadedfiles/emp\\_rch/d186385b-b3ee-40db-9aa0-ef1d9d212fce.pdf](http://www.lincoln.edu.my:67/uploadedfiles/emp_rch/d186385b-b3ee-40db-9aa0-ef1d9d212fce.pdf)
- 7) Hasija S, Ibrahim G, Wadia A. Antimicrobial Activity of *Citrus Sinensis* (Orange), *Citrus Limetta* (Sweet Lime) and *Citrus Limon* (Lemon) Peel Oil on Selected Food Borne Pathogens. IJLSR 2015; 3 (3): 35-39. (Citado: 15/04/2017). Disponible en: <http://www.researchpublish.com/download.php?file=Antimicrobial%20Activity%20of%20Citrus%20Sinensis-2020.pdf&act=book>
- 8) Obidi O, Adelowotan A, Ayoola G, AJohnson O, Hassan M. Antimicrobial activity of orange oil on selected pathogens. IJMBR 2013; 2 (6): 113-122. (Citado: 15/04/2017). Disponible en: [http://www.aessweb.com/pdf-files/ijb%20\(6\),%20113-122.pdf](http://www.aessweb.com/pdf-files/ijb%20(6),%20113-122.pdf)

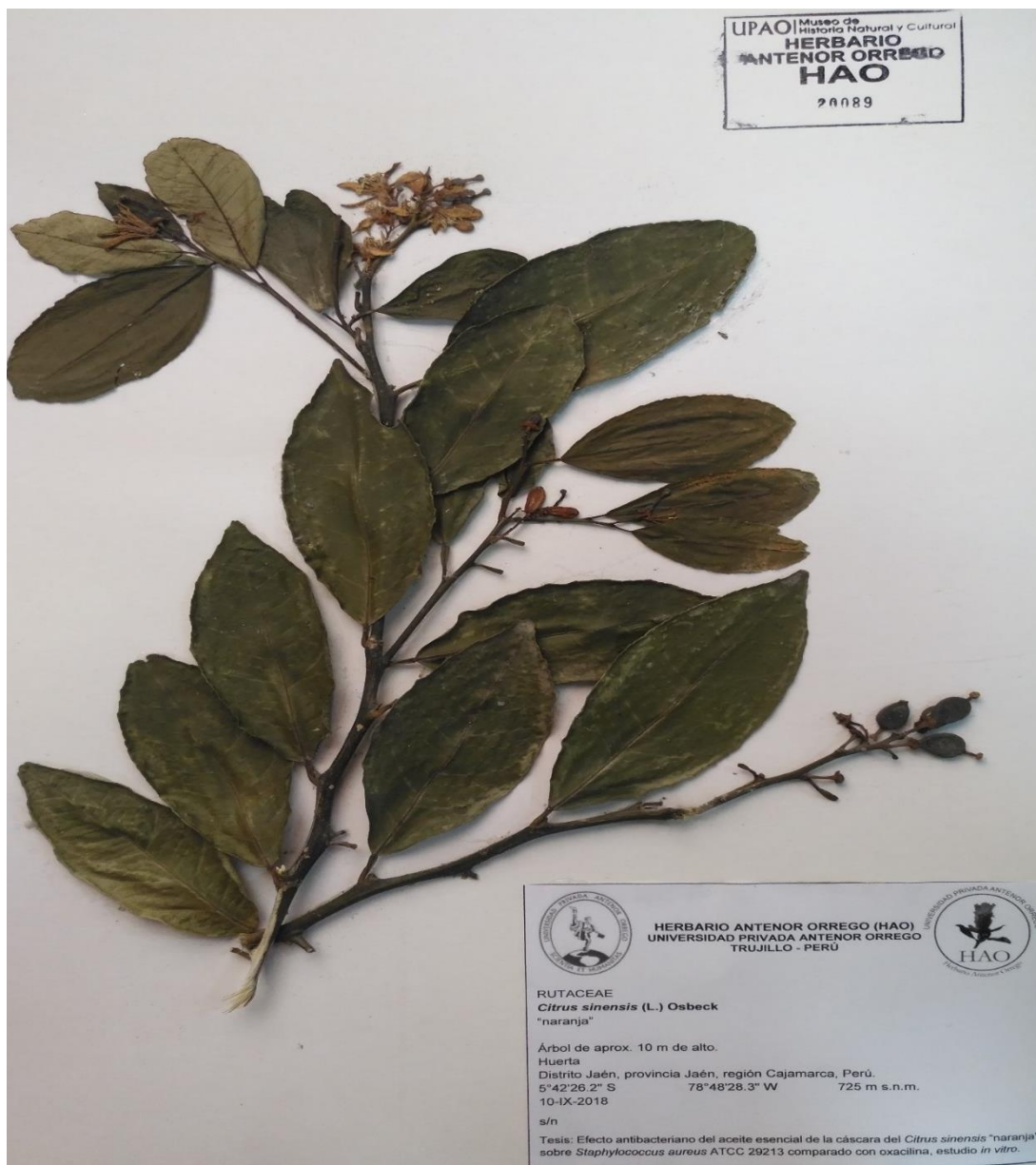
- 9) Espina L, Somolinos M, Lorán S, García D. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. Food Control 2011; 2 (23): 896-902. (Citado: 15/04/2017). Disponible en: <http://sci-hub.io/http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713510003944>
- 10) Juárez J, Américo J, Jáuregui J, Lizano M, Fritz F. Composición química, actividad antibacteriana del aceite esencial de citrus sinensis L. (naranja dulce) y formulación de una forma farmacéutica. Rev Ciencia e Investigación 2010; 13 (1): 9-13. (Citado: 15/04/2017). Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v13\\_n1/pdf/a02v13n1.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v13_n1/pdf/a02v13n1.pdf)
- 11) García F, Mostacero J. Flora etnomedicinal de la región amazónica del Perú. 1ª ed. Trujillo, Perú; 2009.
- 12) Kuklinski C. Farmacognosia estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Barcelona: Omega; 2000.
- 13) Cebrian J. Diccionario de plantas medicinales. 1ª ed. Barcelona: Integra; 2012.
- 14) Valera G. Las plantas medicinales y su beneficio en la salud. 1ª ed. Lima: AIDSESP; 1994.
- 15) Vanaclocha B, Cañigüeral S. Fitoterapia. Vademécum de prescripción. 4ª ed. Barcelona: Masson; 2003.
- 16) Robbers J, Tyler V. Las hierbas medicinales de Tyler uso terapéutico de la fitomecinas. 1ª ed. Barcelona: Acribia S.A; 2006.
- 17) Arenas R. Microbiología medica ilustrada. 5ª ed. Colombia, Santa Fe: Mc Graw Hill; 2014.
- 18) Velasco O, Tay J. Introducción a la microbiología médica. 2ª ed. Barcelona: Mercedes Editores; 2004.
- 19) Bonifaz J. Microbiología medica básica. 2ª ed. Colombia, Santa Fe: Mc Graw Hill; 2012.
- 20) Hardman J, Linbird L, Molinoff P, Ruddon R, Gilman A. Las Bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª ed. México D.F: Mc Graw Hill; 2005.
- 21) Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Ginebra, Suiza: Organización Mundial de la Salud; 2013 (Citado: 17/04/2017). Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
- 22) Paul G, Janet L, Gwendolyn R. Burton's Microbiology for the Health Sciences. 9ª edición. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.

- 23) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26ª ed. CLSI supplement M100S. 19087 USA; 2016. (Citado: 17/05/2017). Disponible en: <http://ljzx.cqrmhospital.com/upfiles/201601/20160112155335884.pdf>
- 24) Dawson B, Trapp R. Bioestadística Médica, 3ª ed. México: Manual Moderno; 1999.
- 25) Peredo H, Palou E, Lopez A. Aceites esenciales método de extracción. Temas selectos de ingeniería de alimentos. JAS. 2009; 3 (1): 24-32. (Citado: 22/04/2017). Disponible en: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
- 26) Ministerio de Salud del Perú. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud; 2002. (Citado: 20/04/2017). Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua l%20sensibilidad.pdf>
- 27) Ministerio de Salud del Perú. Norma técnica de salud de la unidad productora de servicios de patología clínica. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud; 2008. (Citado: 20/06/2017). Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1457.pdf>
- 28) Sistema de Gestión de la Calidad del Pronahebas, Ministerio de Salud (MINSA). Manual de Bioseguridad: Programa Nacional de Hemoterapia y Bancos de Sangre; 2004. Norma técnica N° 015 - MINSA / DGSP - V.01. 2004. Perú. (Citado: 02/06/2017). Disponible en: <http://www.minsa.gob.pe/dgsp/observatorio/documentos/infecciones/manual%20de%20bioseguridad.pdf>
- 29) Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología. Lima [Perú]: CMP; 2007. (Citado: 02/06/2017). Disponible en: [http://cmp.org.pe/wp-content/uploads/2016/05/ley\\_creacion\\_cmp.pdf](http://cmp.org.pe/wp-content/uploads/2016/05/ley_creacion_cmp.pdf)

## VII. ANEXOS

### ANEXO 01

#### IDENTIFICACIÓN TAXONOMICA DE LA PLANTA POR PARTE DE LA UNIVERSIDAD ANTENOR ORREGO





## ANEXO 02

### PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DEL *cascara de Citrus sinensis* “naranja”<sup>25</sup>

#### FUNDAMENTO:

La producción y consumo mundial de aceites esenciales y perfumes están aumentando muy rápidamente. La tecnología de producción es un elemento esencial para mejorar el rendimiento y la calidad global del aceite esencial. Las tecnologías tradicionales relacionadas con el procesamiento de aceite esencial son de gran importancia y todavía se utilizan en muchas partes del globo. La destilación de agua es el método más favorecido de producción de aceite vegetales.

La destilación por arrastre con vapor es un método usado para aislar componentes orgánicas en agua y volátiles, de otras no volátiles que están en una mezcla. La ley de Dalton nos indica que cuando dos o más vapores, que no reaccionan entre sí, se mezclan a temperatura constante cuando sus presiones son las misma generando un sistema de presión total.

#### PREPARACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE CASCARA DE CITRUS SINENSIS “NARANJA”

##### 1. Tratamiento de la muestra

Se obtuvieron 4 kg de *Cascara de Citrus sinensis* “naranja”, en el mercado “La Unión” del distrito Trujillo región la Libertad en el mes de junio del 2017 y se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, donde se seleccionaron los ejemplares con buenas condiciones; de este modo, se obtuvo la “muestra fresca” (MF). La MF se lavó con agua destilada clorada, se colocó sobre una bandeja de cartulina y se llevó a un horno a 40-45°C por 3-4 días donde se deshidrató. Después, se estrujó manualmente el vegetal seco hasta que se obtuvo partículas muy pequeñas y se reservó almacenándolas herméticamente en bolsas negras. A esto se le consideró como “muestra seca” (MS).



Foto 01: Cáscara de *Citrus sinensis* "naranja" seca



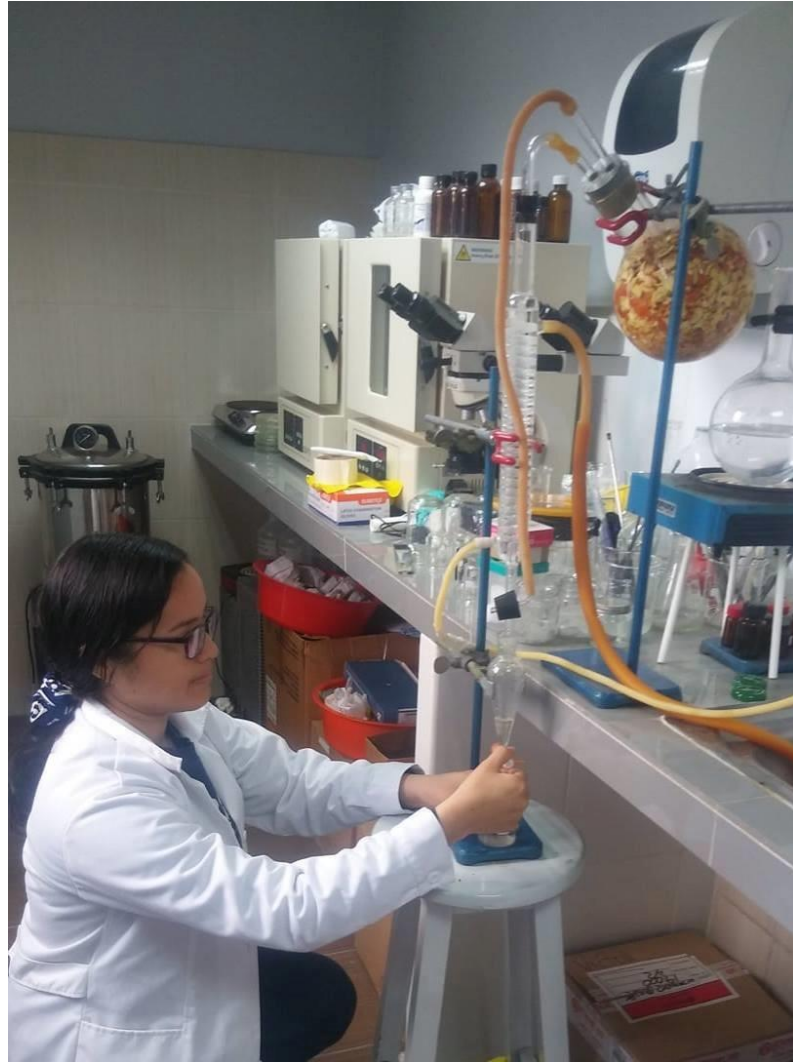
Foto 02: proceso de trituración de la cáscara de *Citrus sinensis*

## 2. Obtención del Aceite Esencial

El aceite esencial de la cáscara de *Citrus sinensis* “naranja” se obtuvo por el método de arrastre de vapor de agua; para ello, en un balón de 2 L se colocó 1,5 L de agua destilada y en un balón de 4 L se colocó la MS hasta que llenó las 3/4 partes del balón. Ambos balones se taparon herméticamente y estuvieron conectados a través de un ducto. Al mismo tiempo el balón con la MS estuvo conectado a un condensador recto (refrigerante), el cual desembocó en un embudo decantador tipo pera. De tal modo que, el Balón con agua se calentó con una cocina eléctrica y el vapor de agua pasó a través del ducto hacia el Balón con la MS y arrastró los componentes fitoquímicos (incluido los lípidos). Este vapor se condujo hacia el condensador en donde se convirtió en líquido que fue recepcionado por el decantador tipo pera. Este líquido se disoció en dos fases, quedando el aceite en la superficie por diferencia de densidades. Este proceso se realizó en 2 horas. De este modo, se obtuvo el Aceite Esencial (AE) considerado al 100%; el cual se colocó en un frasco de vidrio ámbar y se reservó a 4°C hasta su utilización.



Foto 03: Destilación por arrastre con vapor



**Foto 04: Proceso de separación del aceite esencial**

## ANEXO 03

### DETERMINACIÓN DE SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN<sup>26</sup>

#### FUNDAMENTO

El método de antibiograma desarrollado en discos de difusión basado en los trabajos de Kirby y Bauer es una de los métodos que la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para el estudio de sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Este método consiste en preparar los medios de agar en placas de 100 a 150 mm de diámetro, para luego ser inoculados de forma simétrica y en un solo sentido y dejar el inoculo un aproximado de 24 a 48 horas para medir los halos de inhibición en cada placa. Este método también está aprobado por la NCCLS para la investigación de nuevos antimicrobianos.

#### 1. Preparación del medio de cultivo

Se utilizó agar Mueller-Hinton como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 10 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente.

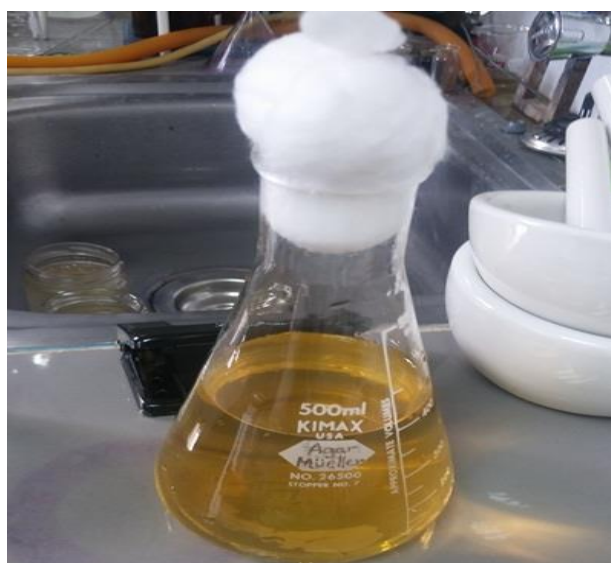
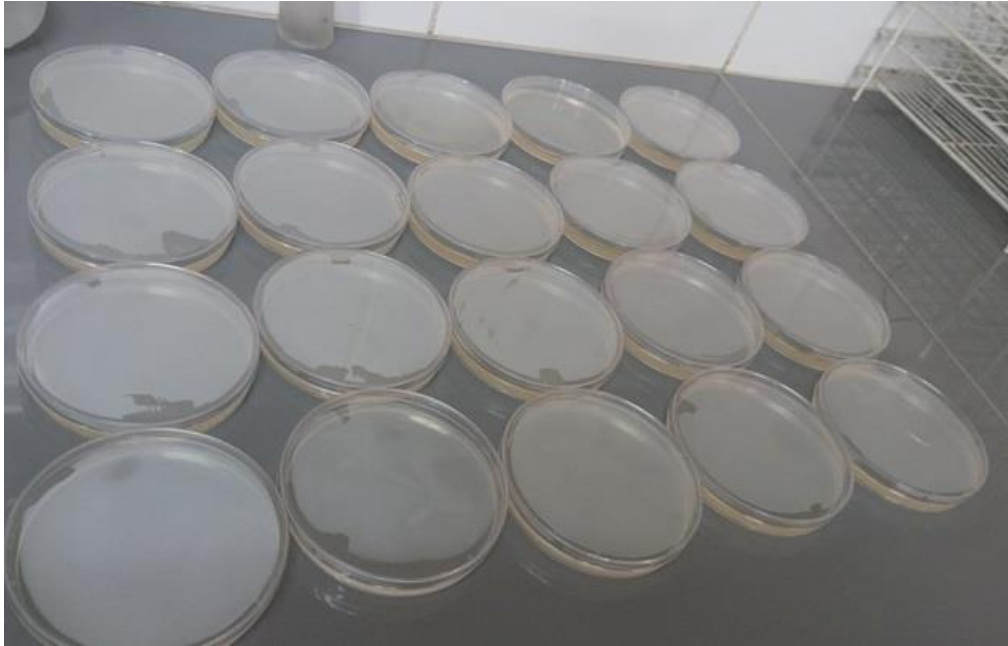


Foto 05: Preparación del agar Mueller Hinton



**Foto 06: Preparación de las placas con agar Mueller Hinton**

## **2. Prueba de susceptibilidad (Prueba de Disco difusión en agar)**

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M02-A12 y M100.

### **a) Preparación del inóculo**

El inóculo se preparó colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Staphylococcus aureus*, cultivado hace 18-20 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml aprox.)





**Foto 07: Preparación del inóculo**

b) Siembra del microorganismo

Se sembró el microorganismo *Staphylococcus aureus*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.

c) Preparación de las concentraciones del AE

A partir del AE, se prepararon 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetil Sulfóxido (DMSO); para ello, se rotularon 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4 concentraciones y se colocó 750  $\mu\text{L}$  de AE y 250  $\mu\text{L}$  de DMSO al tubo de 75%, 500  $\mu\text{L}$  de AE y 500  $\mu\text{L}$  de DMSO al tubo de 50%, y 250  $\mu\text{L}$  de AE y 750  $\mu\text{L}$  de DMSO al tubo de 25%.



Foto 08: Aceite esencial de la cáscara de *Citrus sinensis* almacenado e frasco ámbar



Foto 09: Tubos de ensayo con las diluciones del aceite esencial de la cascara de *Citrus sinensis*



d) Preparación de los discos de sensibilidad con AE

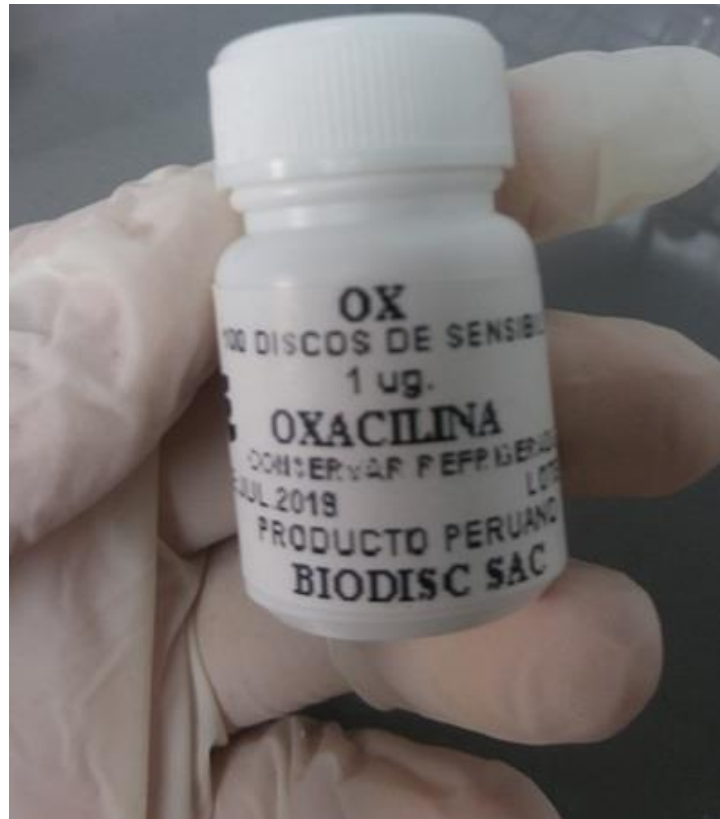
A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10  $\mu$ L en cada disco de papel filtro Whatman N° 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10  $\mu$ L de AE al 25% y se colocó en un disco, 10  $\mu$ L de AE al 50% en otro disco, 10  $\mu$ L de AE al 75% en otro disco y 10  $\mu$ L de AE al 100% en otro disco. Esto se repitió por 10 veces.



**Foto 10: preparación de las diferentes concentraciones del aceite esencial**



**Foto 11: Preparación de los discos con diferente concentraciones del aceite esencial de la cáscara de *Citrus sinensis***



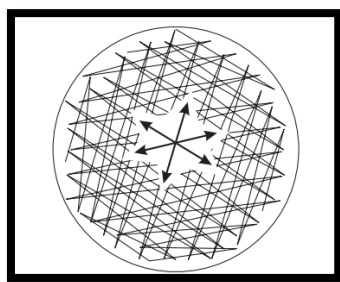
**Foto 12: Frasco con los discos con oxacilina a dosis de 1 µg**

e) Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano

Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con AE, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Staphylococcus aureus*, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con oxacilina (control positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas.

f) Lectura e interpretación

La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de AE de cáscara de *Citrus sinensis* y para el oxacilina. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M100 del CLSI.



**Figura 01: direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar** (imagen recogida de MINSA<sup>23</sup>)

## ANEXO 04

### INSTRUMENTO

#### FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Los datos obtenidos serán registrados en la siguiente ficha:

Método empleado: Kirby-Bauer

Cepa empleada: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Aceite esencial de *Citrus sinensis* "naranja".

Número de Repeticiones	Diámetro del Halo de Inhibición(mm)					
	100%	75%	50%	25%	Control positivo Oxacilina	Control negativo DMSO
1	17	14	13	11	26	0
2	16	14	13	11	26	0
3	15	13	12	12	27	0
4	15	13	13	11	27	0
5	14	13	13	11	26	0
6	16	14	14	10	28	0
7	15	14	12	12	26	0
8	16	14	12	11	27	0
9	16	14	12	11	26	0
10	15	13	13	12	26	0

**ANEXO 05**

**VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO POR CADA EXPERTO**

ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO <i>(Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)</i>		CONSTRUCTO <i>(Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)</i>		RELEVANCIA <i>(El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)</i>		COHERENCIA INTERNA <i>(El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo )</i>		CLARIDAD <i>(El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)</i>		SUFICIENCIA <i>(Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)</i>	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1												
2												
3												
4												

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES	SI	NO	OBSERVACIÓN
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos			
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación			

Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial				
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiera los ítems a añadir				
VALIDEZ				
APLICABLE		NO APLICABLE		APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN

Validado por: Dr. Polo Gamboa Jaime

Fecha:

\_\_\_\_\_

Firma y sello

## **ANEXO 06**

### **MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD PARA EL ESTUDIO EXPERIMENTAL<sup>28</sup>**

#### **AMBIENTE SEGURO:**

Limpieza: se lavará con agua y detergente, luego sin éste, realizando una acción mecánica o de arrastre sobre las superficies. La limpieza se realizará antes de todos los procedimientos de desinfección y esterilización todas las áreas.

La limpieza se realizará con paños húmedos y el barrido por medio de escoba húmeda, con la intención de prevenir la resuspensión de los microorganismos que se encuentran en el piso. Se iniciará por las partes más altas, siguiendo la línea horizontal, descendiendo por planos.

Desinfección: Se realizará utilizando principalmente agentes químicos en estado líquido, como el alcohol a 70%, la pasteurización a 75°C y la irradiación ultravioleta.

Descontaminación: Se realizará un tratamiento químico aplicado a objetos que tuvieron contacto con sangre o fluido corporales, con el fin de inactivar microorganismos en piel u otros tejidos corporales.

Esterilización: Esterilización por vapor, esterilización por calor seco, esterilización por inmersión en productos químicos.

#### **PROTECCIÓN CORPORAL**

Se hará uso de mandiles o batas, siendo esta una prioridad multifactorial para el ingreso a la área de trabajo, y en la realización de todos los procedimientos por parte de los integrantes del equipo.

Recomendaciones:

- Se usará bata, chaqueta o uniforme dentro de las instalaciones de trabajo (laboratorio).
- Esta ropa protectora fue retirada inmediatamente antes de abandonar el laboratorio.
- Fue transportada de manera adecuada a un lugar para posterior descontaminación y lavado.



## **PROTECCIÓN OCULAR Y TAPABOCA**

El uso de lentes y de mascarillas tiene como fin proteger las membranas de las mucosas de boca, nariz y ojos durante los procedimientos y actividades que puedan generar aerosoles, y salpicaduras de fluidos.

Anteojos o lentes de Seguridad:

- Permiten una correcta visión.
- Tienen protección lateral y frontal, ventilación indirecta, visor de policarbonato, sistema antirrayaduras y antiempañantes.
- Permiten el uso simultáneo de lentes correctores.
- Son de uso personal.
- Serán usados en todo momento durante los procesamiento de las muestras y el fraccionamiento de las unidades de fluidos. Cualquier excepción a esta regla, fue descrita en el programa de bioseguridad del servicio.

### **TAPABOCA:**

- Es de material impermeable frente a aerosoles o salpicaduras.
- Es amplio de tal forma que cubre la nariz y toda la boca.
- Será utilizado por el equipo durante todo el tiempo manteniéndolo limpio y sin deformación. Esto debido al tiempo de uso y cuidados que recibe.

### **PROTECCIÓN DE LOS PIES:**

La protección se realizara para evitar lesiones producidas por sustancias corrosivas, descargas eléctricas, objetos pesados, así como para prevenir deslizamientos en pisos húmedos. Si cayera al suelo una sustancia corrosiva o un objeto pesado.

No se llevara ninguno de los siguientes tipos de calzados para transitar en el laboratorio:

- Zuecos
- Tacones altos
- Zapatos que dejen el pie al descubierto

Se elegirá un calzado de cuero resistente que cubrió todo el pie. Este tipo de calzado proporcione una mejor protección.

## **PROTECCIÓN DE LAS MANOS**

Se hará uso de guantes para prevenir o disminuir el riesgo de contaminación con los microorganismos de la piel del operador, como de la transmisión de gérmenes manipulados hacia el operador. Las manos fueron lavadas según técnica clínica con solución a base de clorexidina y secadas antes del calzado de los guantes los cuales fueron estériles.

## **ANEXO 07**

En el presente trabajo se respetó el principio de ética adoptado en el capítulo 6 del código de ética del Colegio Médico del Perú, Art 48.<sup>29</sup>

*Art. 48: “El médico debe presentar la información proveniente de una investigación médica, para su publicación, independientemente de los resultados, sin incurrir en falsificación ni plagio y declarando si tiene o no conflicto de interés”.*

## ANEXO 08

Efecto antibacteriano del aceite esencial de la cáscara del *Citrus sinensis* “naranja” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 comparado con oxacilina, estudio in vitro.

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente:						
HSD Tukey						
(I) Concentraciones		Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	95%	
					Límite inferior	Límite superior
100%	75%	1.900*	0.280	0.000	1.07	2.73
	50%	2.800*	0.280	0.000	1.97	3.63
	25%	4.300*	0.280	0.000	3.47	5.13
	Oxacilina	-11.000*	0.280	0.000	-11.83	-10.17
	SSF	15.500*	0.280	0.000	14.67	16.33
75%	100%	-1.900*	0.280	0.000	-2.73	-1.07
	50%	.900*	0.280	0.025	0.07	1.73
	25%	2.400*	0.280	0.000	1.57	3.23
	Oxacilina	-12.900*	0.280	0.000	-13.73	-12.07
	SSF	13.600*	0.280	0.000	12.77	14.43
50%	100%	-2.800*	0.280	0.000	-3.63	-1.97
	75%	-.900*	0.280	0.025	-1.73	-0.07
	25%	1.500*	0.280	0.000	0.67	2.33
	Oxacilina	-13.800*	0.280	0.000	-14.63	-12.97
	SSF	12.700*	0.280	0.000	11.87	13.53
25%	100%	-4.300*	0.280	0.000	-5.13	-3.47
	75%	-2.400*	0.280	0.000	-3.23	-1.57
	50%	-1.500*	0.280	0.000	-2.33	-0.67
	Oxacilina	-15.300*	0.280	0.000	-16.13	-14.47
	SSF	11.200*	0.280	0.000	10.37	12.03
Oxacilina	100%	11.000*	0.280	0.000	10.17	11.83
	75%	12.900*	0.280	0.000	12.07	13.73
	50%	13.800*	0.280	0.000	12.97	14.63
	25%	15.300*	0.280	0.000	14.47	16.13
	SSF	26.500*	0.280	0.000	25.67	27.33
SSF	100%	-15.500*	0.280	0.000	-16.33	-14.67
	75%	-13.600*	0.280	0.000	-14.43	-12.77
	50%	-12.700*	0.280	0.000	-13.53	-11.87
	25%	-11.200*	0.280	0.000	-12.03	-10.37
	Oxacilina	-26.500*	0.280	0.000	-27.33	-25.67

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

## Anexo 09

### Prueba de homogeneidad de varianzas para el uso de post Anova de Tukey

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
,786	4	45	,540

## Anexo 10

### Efecto antibacteriano según criterio CLSI

	Eficaz	No Eficaz
Concentración	$\geq 13$	$< 13$
25%	–	100
50%	60	40
75%	100	–
100%	100	–
Oxacilina	100	–